

インフルエンザウイルスを計測・除去可能な「スーパー抗体酵素」

一二三 恵美

大分大学先端医工学研究センター

1. 研究のねらい

「スーパー抗体酵素」は狙ったタンパク質を希望通り破壊できる特徴を有している。本研究ではインフルエンザウイルスを標的とし、免疫工学、タンパク質工学、遺伝子工学的手法を駆使することにより、同ウイルスを特異的かつ容易に計測・除去できる性能をもつ「スーパー抗体酵素」を創製する。本研究の成果は同ウイルスを定量可能な計測機器開発へと結びつき、大気中の同ウイルスを正確に測定することで感染予防へと繋がる。

具体的にはインフルエンザウイルス構成タンパク質として、感染時に主要な役割を担う Hemagglutinin(HA)を標的とする。特徴として、これまで大流行を繰り返している、あるいは大流行が予測される A 型インフルエンザウイルスの HA に焦点を当て、A 型の HA 全てに反応する特徴のある抗体の作製を行い、その中から抗原を破壊できる「スーパー抗体酵素」を取得する。続いて「スーパー抗体酵素」を遺伝子工学的に大量取得する系を確立し、なおかつ、「スーパー抗体酵素」遺伝子に変異を入れて酵素活性の作用メカニズムを解明するとともに、酵素活性を向上させ、実用に近い「スーパー抗体酵素」を作製するのが狙いである。

2. 研究成果

2-1. 標的配列の特定

A 型インフルエンザウイルスの HA は、HA₁ と HA₂ の 2 つのサブユニットから成る分子で、16 種類 (H1~H16) の亜型が存在する。そこで、Flu database (NCBI) に登録されている配列データを用いて 16 種類の亜型について consensus 配列を作製した。この配列を比較して全ての亜型で高度に保存されている領域を HA₁ と HA₂ のそれぞれから抽出し、これを第一候補とした。

次に、これまでに大流行を起こした H1 型 (スペイン風邪), H2 (アジア風邪), H3 (香港風邪) と、トリインフルエンザの H5 型に着目して解析した。Fig.1 は、この 4 種類の重要な HA について HA₂ 領域の consensus 配列を比較したものである。四角の枠で囲んだ領域が高い保存性を有しており、HA の立体構造を考慮に入れて、これらの配列を本研究で行う抗原ペプチドとして特定した。これらはそれぞれ、IH2, InfA, InfB, InfC ペプチドと命名し (IH2 については HA₁ サブユニット上の保存性の高い配列を繋げて IH とした) 化学合成した。

2-2. 抗ヘマグルチニン (モノクローナル) 抗体の作製

BSA(ウシ血清アルブミン)や KLH(スカシ貝ヘモシアニン)を IH, InfA, InfB, InfC ペプチドにコンジュゲートさせ、ペプチドハプテンとして Balb/c マウスに免疫して PEG 法による細胞融合を行い (親株は NS-1 細胞)、

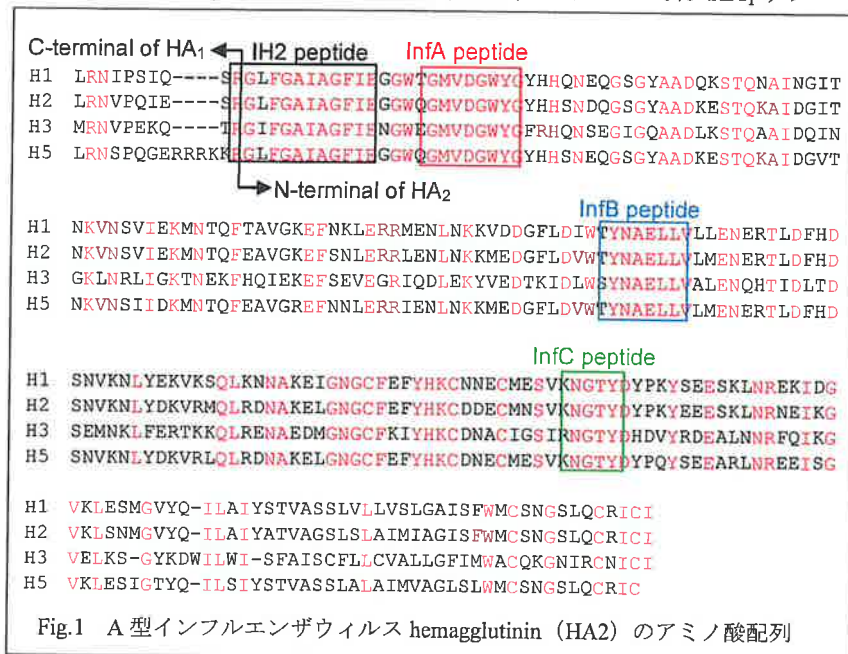


Fig.1 A 型インフルエンザウイルス hemagglutinin (HA2) のアミノ酸配列

モノクローナル抗体を作製した。上記抗原ペプチド中で InfA は高い免疫応答を示したが、IH と InfB は中程度であった。InfC ペプチドは全く免疫応答を示さなかった。そこで本研究では IH および InfA ペプチドで免疫したマウスに対して細胞融合を行い、得られたモノクローナル抗体をそれぞれ IH シリーズおよび InfA シリーズとして以下の研究に用いた。

IH シリーズでは IHB1, IHB2, IHK の 3 種類のモノクローナル抗体を産生する細胞株を、InfA シリーズでは InfA-3, 6, 9, 10, 15, 18 の 6 種類の抗体産生細胞株を確立した。

2-3. 抗体遺伝子の解析と立体構造構築

上記で作製したモノクローナル抗体は以下の方法ですべてその塩基配列を決定した。

まず、モノクローナル抗体産生細胞(1×10^6 個)から、RNeasy^R Protect Mini Kit (QIAGEN)を用いて total RNA を抽出した。逆転写反応によって cDNA を合成後、Ig primer set(Novagen)を用いる PCR で H 鎖、または L 鎖抗体可変領域遺伝子を増幅させた。これを pCR-Blunt II-TOPO vector (Invitrogen)にクローニングして塩基配列を決定し、アミノ酸に変換した。この配列を用いて V gene の由来する germline gene を Ig BLAST(NCBI)を用いて相同性検索すると共に、抗体可変領域の立体構造解析を分子モデリングにより行った(ソフトウェアは AbM, プラットフォームは SG 社のワークステーション Octane2)。Germline gene との相同性検索の結果は Table 1 に示した。

2-4. ヘマグルチニン分子(抗原)の遺伝子工学的合成

H1N1 および H3N2 型インフルエンザウイルスの HA 分子はそれぞれ(A/Hiroshima/5/2001 (H1N1))および(A/Hiroshima/5/2001 (H3N1))ウイルスを鋳型に HA₂ 領域遺伝子を PCR で増幅して、最終的に pET21a vector に組み込んだ。これを用いて発現用大腸菌(Rosseta-gami (DE3))を形質転換して IPTG 誘導により発現させ、目的の HA 分子を回収した。

2-5. 抗体の免疫学的反応性

以下の実験に入る前に上記で合成したレコンビナントヘマグルチニン分子(rec HA₂)をマウスに免疫し、モノクローナル抗体とは別にポリクローナル抗体(抗血清)も作製した。

2-5-1. ヘマグルチニン分子

Fig.2(A)は、H1N1 型インフルエンザウイルスを 1%TritonX-100 で処理した SDS-PAGE(銀染色)の結果である。鶏卵培養で取得したウイルスなので、ウイルス以外のタンパク質も見受けられるが 26 kDa 付近のバンドが HA₂ とと思われる。Fig. 2(B)のウェスタンブロットリングは上記で得た抗血清を使って実験を行った結果で、26~29 kDa に HA₂ に相当する強いバンドが確認された(還元・非還元共に)。また、dimer および trimer に相当する 53 および 83 kDa のバンドがそれぞれ観察され、これがインフルエンザウイルス H1N1 型の HA₂ サブユニットであることを確認した。

2-5-2. インフルエンザウイルス

作製したモノクローナル抗体の IH および InfA シリーズについてインフルエンザウイルスとの反応性をウェスタンブロットリング法により調べた。IH シリーズでは、IHB1 抗体が HA₂ に弱く反

Table 1 各抗体 L 鎖が属していた Vk germline gene

clone	IHB1	IHB2	IHK, InfA-18	InfA-3, 6, 9, 10	InfA-15
Vk germline	ce9	19-23	8-21	cr1	bl1

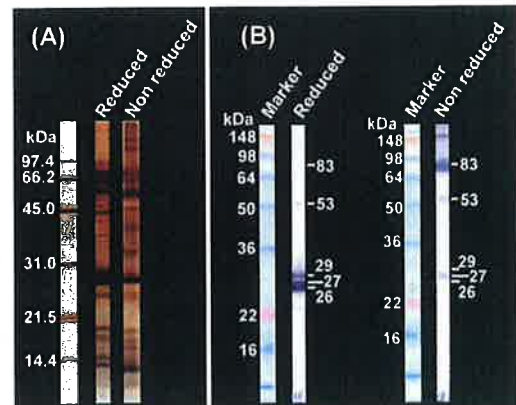


Fig.2 H1N1 型ウイルスの SDS-PAGE および抗 HA₂ 血清を用いたウェスタンブロットリング

A: 不活化 H1N1 ウイルス(鶏卵培養)の電気泳動の結果

B: 抗 HA₂ 血清を用いたウェスタンブロットリングによる HA₂ 分子の検出

応したものの (Fig.3(B))、IHB2 および IHB1 抗体はウイルスの HA には反応しなかった。

InfA シリーズでは、InfA-15 抗体で 28 kDa 付近に強いバンドが観察されたが、さらに薄いバンドが 53 kDa と 83kDa に見られた。これらは、HA₂ の monomer, dimer, trimer である。極めて薄いバンドであるが、同様の傾向が他の 5 種類の抗体についても観察され、どの抗体も H1N1 ウィルスには反応した (Fig.3(A))。

一方、同じウェスタンブロットを H3N1 ウィルスについて行くと、InfA-15 抗体だけが反応性を示し、他の抗体は反応しなかった (Fig.4)。さらにこの InfA15 抗体は、H5 型の recombinant HA₂ とも反応しており、重要なインフルエンザウィルスのすべての型に反応する特徴的な抗体であると思われた (論文投稿中)。

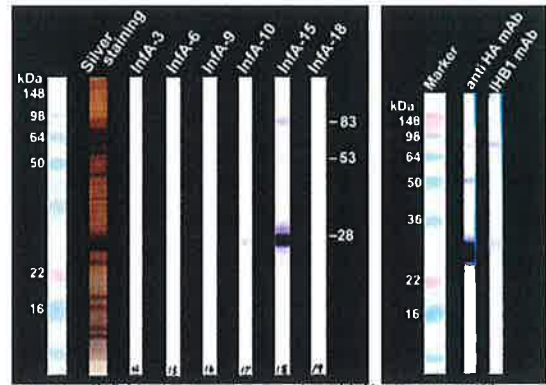


Fig.3 作製したモノクローナル抗体の H1N1 型ウィルスに対する反応性

A: H1N1 型ウィルスに対する InfA 抗体の反応性
B: H1N1 型ウィルスに対する IHB1 抗体の反応性

2-6. 抗体の物理化学的および生化学的性質

2-6-1. 抗体の抗原親和性

InfA シリーズのモノクローナル抗体は InfA-15 mAb が特徴的な性質を示した。そこでこの一連の抗体の抗原親和性を、超高感度カロリメーターを用いて測定した。抗原には免疫に用いた InfA ペプチドを使用した。InfA-15 抗体では $K=1 \times 10^{-7}/M$ であったのに対して、他の InfA シリーズの抗体はおよそ $10^{-8}/M$ であった。InfA-15 抗体はシリーズの中で少し変わった性質をしているようである。

2-6-2. 抗体の構造多様性～2次元電気泳動による解析～

モノクローナル抗体のひとつひとつの分子は配列が同一であり、どのような状況下でも (生化学的あるいは免疫化学的) 性質は同じであると考えられてきた。ところが最近、モノクローナル抗体でありながら、ある場合には抗原特異性を発揮できるが、別な環境では抗原に結合できないという事実が報告されている。即ち、モノクローナル抗体にも構造的な多様性が存在する、という結論である。本研究ではこうした現象とは関係なく InfA シリーズの抗体の 2次元電気泳動解析を行っていたが、これに関連すると思われる興味ある現象を見出した。その結果を Fig.5 に示した。マウス腹水から高純度に精製してきたモノクローナル抗体でありながら、同じサイズの位置に、等電点の異なる複数のスポットが観察された。スポット数は抗体によって異なり、InfA-9 抗体 L 鎖においては 7 つ以上のスポットが同一サイズの位置に観察された。一方、同じ V_H germline gene(cr1) に属する InfA-3,-6 抗体の L 鎖は 2-3 のスポットである。まだ、現段階では不明であるが、明らかに等電点の異なる (構造的に異なる) 状態で存在している可能性がある。おのおの抗体鎖がどのように異なる生化学的あるいは免疫化学的挙動を示すのか興味を持たれる。

2-7. 抗体の遺伝子工学的合成と精製

抗体遺伝子 (L 鎖)

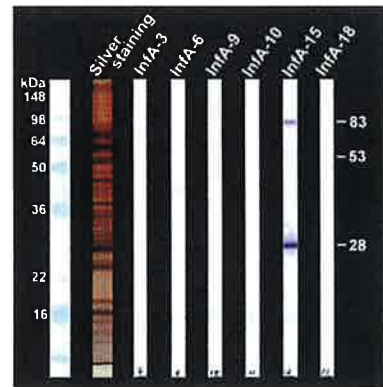


Fig.4 InfA モノクローナル抗体の H3N2 型ウィルスに対する反応性

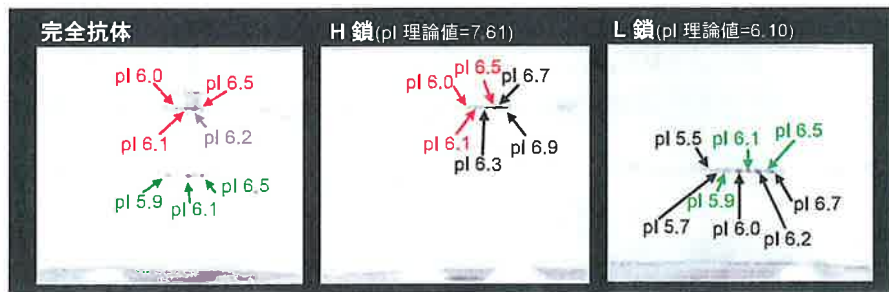


Fig.5 InfA-9 抗体および抗体鎖の 2次元電気泳動

全長)は、2-3項に準じた方法で5', 3'末端それぞれに制限酵素サイトを付加して pBR-Blunt II-TOPO vector (Invitrogen) にサブクローニングした後、発現用 vector に組み換えて抗体鎖単独と Protein A-tag を付加する形で大腸菌 BL21(DE3)pLysS (Novagen) に発現させた。

培養条件や誘導条件をコントロールすることで、抗体鎖単独、Protein-A tag 付加ともに培養液 1 mL あたり約 40 μ g の抗体鎖を可溶化した状態で発現させることが可能となった。Protein A-tag を付加した系については、抗体カラムを用いて可溶性画分より Affinity 精製を進めている。まだ小スケールの精製であるが、1回の精製で 1.3 mg の L 鎖を得ることが出来た。マウス腹水から精製した抗体を使って化学的に分離・精製する従来の方法では、約 1 週間かけて 5 mg の精製抗体から得られる L 鎖は 700 μ g 程度であった。発現抗体の精製スケールを上げることは容易なので、構造解析や抗原との反応に用いる量の抗体鎖を得る手法の目途が立った。

2-8. 抗体(鎖)の酵素活性

完全抗体から分離・精製した抗体鎖、および完全抗体について免疫に用いた抗原ペプチドや peptidyl-MCA 基質(ペプチド研)を用いて peptidase 活性の有無を調べている。これまで扱ってきた例では、完全抗体には酵素活性が認められず、抗体鎖に分離した場合に酵素活性が発揮されていた。ところが、抗原ペプチドに対する Affinity の低い InfA15 抗体では完全抗体が酵素活性を示すという興味深い結果を得た。peptidase 活性を発揮している抗体鎖を含めて遺伝子工学的に発現させ、構造解析を進めると共に、酵素活性を向上させるための変異導入を進める。

2-9. まとめ

本研究ではまず、全ての A 型インフルエンザウイルスに反応する(撃退する)ことを目的とした抗原の設計に取り組んだ。特に注目すべき分子としてウイルスの感染に必須な HA 分子に焦点をあてた(タミフルはインフルエンザウイルスの増殖に関与するノイラミニダーゼを阻害する)。それはウイルスの感染を防ぐことが第 1 目的だからである。結果として HA で高度に保存されている領域の IH, InfA, InfB, InfC ペプチドを特定し、この中で InfA ペプチドが特徴ある抗体(InA-15 mAb)を誘導出来ることが判った(特許出願)。この実験と並行して亜型の異なる HA 分子を遺伝子工学的に合成し、その分子およびインフルエンザウイルス(鶏卵培養)を用いて免疫学的反応性を検討した結果、InA-15 mAb はどのウイルスにも反応する可能性を示した。また、この抗体は完全抗体のまま amidase 活性を示し、抗体酵素であることが判った。本研究を現実的な成果に結びつけるには、遺伝子工学的に「スーパー抗体酵素」の作製を行う必要があり、このための研究に取り組んだ結果、適切な vector および発現条件を選ぶことにより、10 mg~数 10 mg/L レベルで多量の目的タンパク質が作製出来る系をほぼ確立できた。これを利用して遺伝子操作により実用化可能な性能をもつ「スーパー抗体酵素」の取得、および大量生産が出来る段階に漕ぎ着けた。

また、本研究の副次的な成果として抗体の構造多様性という新しい概念を解明する手がかりがつかめた。

3. 主な発表

論文

- ・ A characteristic monoclonal antibody against hemagglutinin molecule of influenza virus A type, E. Hifumi, N. Fujimoto, S. Yoshida, T. Uda *Biotech. Bioeng.*, (in submission)
- ・ 酵素活性と抗体機能を持つ分子ナノマシン~アンチゲナーゼ~, 一二三恵美, 宇田泰三, 現代化学, 437(8), 43-50(2007)

招待講演

- ・ 一二三恵美, アンチゲナーゼの機能と応用, 第 3 回産業用酵素シンポジウム, 2008 年 3 月

4. 特許

- ・ 一二三恵美, 宇田泰三, 「抗原ペプチドおよびその利用」, 特願 2007-187324, 出願人: 独立行政法人科学技術振興機構